

人胃粘膜活检标本测氨法诊断幽门螺杆菌感染

陈瑞川 张长弓 方莹 颜江华 (厦门大学抗癌研究中心, 厦门 361005)

Nessler's NH_3 Detection Method for Rapid Diagnosing Helicobacter Pylori Infection in Human Gastric Mucosa

Chen Ruichuan, Zhang Changgong, Fang Yin, et al. (Cancer Research Center of Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Purpose: To evaluate the method for rapid diagnosis of Helicobacter pylori (H. pylori) infection in human gastric mucosa with Nessler's reagent. Method: This "Nessler's color reaction — urease test" (NUT) method is based on detecting the preformed trace NH_4^+ in mucosa yielded by urea hydrolysis of H. pylori urease and its results can be judged either by naked eye's observation or by instrument's detection. NUT detection biopsy specimens from 485 patients referred to gastroendoscopy investigation was studied with the comparison of bacterium culture and smear staining, as well as ELISA. Results: The performance of NUT showed that the method possessed high sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and diagnostic efficiency of 97.0%, 98.3%, 99.4%, 91.3% and 97.3%, respectively for detecting H. pylori infection in human gastric mucosa. Conclusion: The studies reveal that the detection principle of NUT is different from traditional urease test and is a more rapid, convenient, sensitive and specific new method than all other detective method for H. pylori infection based on biopsy specimen.

Key Words Helicobacter pylori Diagnosis Nessler's reagent

摘要 目的: 探讨人胃粘膜 Hp 感染的检测法。方法: 以纳氏测氨法为基础建立了纳氏试剂快速显色检测人胃粘膜中幽门螺杆菌 (Hp) 感染的方法, 临床检测 485 例因上消化道症状而行胃镜检查的患者, 并以细菌培养、粘膜涂片镜检及血清抗 Hp-IgG ELISA 检测结果为对照。结果: 该法的敏感性、特异性、阳性及阴性预测值和诊断效率分别为 97.0%, 98.3%, 99.4%, 91.3% 及 97.3%。结论: 该法检测 Hp 感染的原理及特点初步分析表明其与传统尿素酶试验有较大的差别, 有一定的实用价值。

关键词 幽门螺杆菌 诊断 纳氏试剂

幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori, Hp) 感染的诊断和根除对于治疗上消化道疾病、降低胃癌发生率等均具有重要意义^[1]。由于 Hp 在胃内能产生 NH_3 , 因此 Hp 感染者胃液氨浓度较非感染者高。曾有报道测定胃液氨浓度诊断 Hp 感染, 但因方法繁琐而未能推广^[2]。本文参考临床生化检验方法中纳氏试剂比色测定血氨的原理^[3], 建立了以纳氏试剂快速显色诊断人胃粘膜 Hp 感染的方法——粘膜测氨诊断法, 并对该法检测人胃粘膜 Hp 感染的机理、特点及诊断效率作了初步分析。

1 材料与方法

1.1 材料

标本收集 人胃粘膜活检标本取自 485 例行胃镜检查患者的胃窦部 (3 块) 及胃体部 (1 块)。所检患者均采集血清 2ml, 分离血清后冻存于 -20°C 供 ELISA 检测抗 Hp-IgG。

试剂 ELISA 检测试剂盒由本单位细胞生物化学研究室提供。KI 及 HgI_2 等化学试剂均购自上海化学试剂商店。

仪器 紫外/可见分光光度计为美国 BECKMEN 公司产的 DU-65 型。酶标读数仪为美国 Dynate 公司产的 MINIREADER I 型。

1.2 方法

粘膜测氨诊断试剂配制 按文献^[3]所述配制纳氏试剂原液, 以 2.0mol/L KOH 稀释 4 倍后室温静置一周, 取上清应用; 在 8 孔或 12 孔条微孔中, 每孔加 50 μl 0.133mol/L 尿素, 50 $^\circ\text{C}$ 烘干过夜, 置阴凉干燥处备用。

胃活检粘膜标本氨含量测定 以粘膜涂片法, 对 56 例活检标本进行快速涂片镜检^[4]。涂片后的标本立即进行氨含量测定: 按血氨测定常规方法^[3]配制纳氏试剂并制作标准曲线; 以活检粘膜代替血氨样品同法对标本进行纳氏比色测定, 将测定结果依标准曲线换算为标本含氨量 (μmol /标本)。

Hp 感染的诊断 活检粘膜的粘膜涂片镜检、细菌培养及菌落鉴定按文献^[4]所述方法操作; 病理组织学检测依文献报道方法^[5], 并按悉尼分类系统分

该文为厦门市科委资助课题

类^[6];ELISA 检测则按试剂盒操作说明书进行。以细菌培养、粘膜涂片镜检法及 ELISA 三项检测结果中同时两项或两项以上阳性者确定该患者为 Hp 感染阳性。

粘膜测氨法诊断 Hp 感染 于包被了尿素的微孔中滴加 2 滴无氨水,待孔内尿素溶解后,用无菌牙签将活检粘膜标本置于孔液中,立即滴加 1 滴纳氏试剂,于白色背景下肉眼观察,反应液由无色转变为淡黄~棕黄色者即为 Hp 阳性,5 分钟后仍无色者为 Hp 阴性;以酶标仪检测则再延长 5 分钟后测定 410nm 处 OD 值(酶标仪以空白反应液调零), $p/n \geq 3.0$, $OD \geq 0.15$ 者为 Hp 阳性。

2 结 果

2.1 Hp 感染阳性与阴性标本的氨含量差别

经纳氏法定量测定,结果表明 Hp 阳性的粘膜活检标本氨含量在 $2.6 \times 10^{-2} \sim 12.8 \times 10^{-2} \mu\text{mol/标本}$,平均值为 $5.4 \pm 1.6 \times 10^{-2} \mu\text{mol/标本}$;而 Hp 阴性标本的氨含量则在 $1.0 \times 10^{-2} \sim 2.4 \times 10^{-2} \mu\text{mol/标本}$,平均值为 $1.6 \pm 0.37 \times 10^{-2} \mu\text{mol/标本}$ 。表明 Hp 阳性及阴性标本的氨含量间有差别,可作为粘膜测氨法诊断 Hp 感染的依据。

2.2 尿素对纳氏试剂显色反应的影响

在对纳氏试剂和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标准液的显色反应溶液进行吸收光谱扫描时,发现添加尿素可降低显色反应液的光吸收值。进一步实验证实:显色反应液的 OD 值随添加尿素浓度的提高而下降,并呈较好的线性关系,表明添加一定浓度的尿素可消除正常胃粘膜氨本底所呈的颜色。经实验显示:在微孔中添加 $50 \mu\text{l}$ 0.133mol/L 的尿素并于 50°C 烘干,即可用于消除氨本底。

2.3 粘膜测氨法诊断 Hp 感染结果

485 例患者中,经细菌培养、粘膜涂片镜检法及 ELISA 检测确定的 Hp 感染阳性者为 368 例(作为“金标准”),感染率为 75.9%。粘膜测氨法目测及仪器测定的结果见表 1,经统计学计算:目测法的敏感性和特异性分别为 97.0%和 98.3%,而仪器测定法判断的敏感性和特异性则分别为 98.4%和 98.3%,两者相符率为 98.6%,表明目测判断与仪器测定判断具有相近的可靠性。粘膜测氨诊断法的诊断效率与细菌培养、粘膜涂片镜检法及 ELISA 检测法的诊断效率比较见表 2,显示粘膜测氨诊断法的诊断效率高与其它三种方法。

2.4 Hp 感染与胃部疾病的关系

485 例患者经病理组织学检查和分类后,与 Hp

感染的关系分析见表 3。由表 3 可见,十二指肠溃疡患者中,Hp 的感染率最高,其次为胃溃疡,慢性浅表性胃炎与慢性萎缩性胃炎的感染率相近,6 例胃癌患者中 4 例 Hp 阳性,但例数少统计学意义不大。

表 1 NUT 检测结果与“金标准”的比较

NUT 检测		“金标准”		合 计
结 果		阳性	阴性	
阳性	目测	357	2	359
	酶标仪	362	2	364
阴性	目测	11	115	126
	酶标仪	6	115	121
合计	目测	368	117	485
	酶标仪	368	117	485

表 2 四种检测方法的诊断效率

	“金标准”	细菌培养	粘膜涂片	ELISA	NUT 法 (目测)
阳 性(例)	368	264	354	348	359
阴 性(例)	117	221	131	137	126
假阳性(例)	—	3	7	9	2
假阴性(例)	—	107	21	29	2
敏感性(%)	—	70.9	94.3	92.1	97.0
特异性(%)	—	97.4	94.0	92.3	98.3
阳性预测值(%)	—	98.9	98.0	97.4	99.4
阴性预测值(%)	—	51.6	84.0	78.8	91.3
诊断效率*(%)	—	77.3	94.2	92.3	97.3

* 诊断效率 = 总例数 - (假阳性 + 假阴性) $\times 100\%$ / 总例数

表 3 Hp 感染与各类胃部疾病的关系

胃部疾病	例数	阳性	感染率(%)
慢性浅表性胃炎	265	184	72.6
慢性萎缩性胃炎	80	60	75.0
胃 溃 疡	31	25	80.7
十二指肠溃疡	70	67	95.7
肠 化 生	23	18	78.3
不典型增生	11	9	81.8
胃 癌	6	4	66.7
总 计	476	367	77.1

2.5 粘膜测氨诊断法试剂的特点

对粘膜测氨诊断试剂的有关特点作了较系统的研究,实验表明该试剂具有如下特点:①以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标准液($100 \mu\text{l}$)代替粘膜标本进行显色反应,显示在 $0.15 \text{mmol/L} \sim 1.0 \text{mmol/L}$ 浓度范围内,线性良好,无混浊,温度影响较小;②将 Hp 阴性的胃粘膜活检标本的显色反应液于室温放置半小时后观察仍显无色,酶标仪测定 $OD < 0.15$, $p/n > 3.0$;③包被尿素若潮解,可使反应本底增高,出现假阳性,此外酒精、甲醛、新洁尔灭等胃镜常用消毒剂对显色反应影响较大,也可导致假阳性。

3 讨 论

目前以 Hp 尿素酶活性为依据研制的尿素酶试验方法很多^[4],虽然各自的配方、形式不同,但其原理基本类似。一般均以酚红为 pH 指示剂,依靠 Hp 的尿素酶分解试验介质中的尿素产生氨来促使介质 pH 提高,使酚红变色从而判断结果。从生化角度来看,这些传统的尿素酶试验相当于在体外测定 Hp 尿素酶活性试验。

定植于胃粘膜上的 Hp 所产生的高活性尿素酶能水解胃液中的尿素形成氨,而 NH₃ 能在 Hp 菌体周围形成保护性“氨云”,并中和胃酸的酸性杀菌作用,同时也使 Hp 感染者胃液氨浓度较非感染者高^[2],但由于尿素酶的持续水解尿素产氨作用,以不断补充被胃酸中和了的氨,因此 Hp 定植灶内的氨含量不仅应高于非感染者,而且处于动态平衡的状态,其氨含量的波动性应比胃液中氨浓度变化更小。我们的实验结果证实了上述推测,表明 Hp 感染者与非感染者胃粘膜氨含量上存在差别,这是本研究的依据。在微孔中包被尿素是为了消除氨本底,而 Hp 的尿素酶在强碱性的纳氏试剂中即失活,因此粘膜测氨诊断法检测的是 Hp 感染灶在体内即已存在的高含量的氨,在检测机理上与传统尿素酶试验有较大的差别。

经 Hp 感染诊断,表明胃镜检查人群中 Hp 感染率为 75.9%,与文献报道^[1]基本相符。Hp 感染被认

为是导致慢性胃炎及消化性溃疡的致病因素,并与胃癌的发生有密切的关系^[7]。本文对 Hp 感染与胃部各类疾病的关系分析也证实上述观点,表明 Hp 感染在胃疾病恶化演变中起重要的作用。

对所采用的细菌培养法、粘膜涂片法及 ELISA 检测法和粘膜测氨诊断法的诊断效率比较,表明粘膜测氨法具有较好的诊断效率,而且该法具有可用酶标仪定量测定的独特优点,线性关系良好,可望进一步开发成定量或半定量诊断 Hp 感染的方法,因此具有一定的实用价值。

参考文献

- 1 张锦坤,夏向华.幽门螺杆菌研究的十年里程碑.中华消化杂志,1995,15(增刊):3.
- 2 Neithercut WD. Detection of *Helicobacter pylori* infection of the gastric mucosa by measurement of gastric aspartate, NH₃ and urea concentration. Gut, 1991,32:973.
- 3 福州部队总医院编.临床医学检验.上海:上海科学技术出版社,1984:300.
- 4 Coudron PE, Kirby DF. Comparison of rapid urease test, staining techniques, and grown on different solid media for detection of *Campylobacter pylori*. J of Clin Microbiol, 1989, 27:1527.
- 5 Loffeld FJLF, Stobberingh E, Flendrig JA, et al. Presence of *Helicobacter pylori* in patients with non-ulcer dyspepsia revealing normal antral histological characteristics. Digestion, 1990, 47:29.
- 6 Price AB. The Sydney system: Histological division. J Gastroenterol Hepatol, 1991, 6:207.
- 7 姚光弼,萧树东,李 石,等.幽门螺杆菌专题笔谈.中华消化杂志,1995,15(增刊):56.

(收稿:1996-09-16;修回:1997-01-30)

五例食管贲门癌术后吻合口瘘二次手术报告

朱坤寿 余志廉 方卫民 (福建省肿瘤医院,福州 350014)

5 例病例中食管癌 3 例、贲门癌 2 例;男性 4 例、女性 1 例。吻合口瘘的临床表现以发热、脉速、胸闷、气促为主。早期特点为胸腔引流量多,每天在 800ml 以上,均为咖啡色、酸性或碱性肠内容物。经口服美蓝或钡剂可明确诊断。5 例再手术时,吻合口瘘 4 例,其中手工吻合术 2 例,消化道吻合器吻合术 2 例,另一例为胸胃穿孔。瘘口小于 1cm 的 3 例行单纯修补术;1 例为吻合口裂开约 1/2 周径,行吻合口切除,胃食管重新吻合术;另外 1 例胸胃穿孔于胃底部,大小约 3cm×2cm,经单纯修补后第 1 天再瘘,经积极准备三次进胸见胸胃上 1/3 部位为多灶性坏死,行胸胃上 1/3 部分切除,胃体回纳腹部,分离十二指肠球部以增加胃管长度,经胸胃后到颈部行胃食管单层吻合术,结果此例因 ARDS 死亡。

食管癌、贲门癌切除术后并发吻合口瘘的问题目前尚未完全解决,以往处理以保守治疗为主,有引起病程长的弊端。

我院 5 例中 3 天以内发生瘘的 3 例,胸腔污染均较轻,另 2 例分别发生于第 9、10 天。手术操作要掌握在血供良好、炎症较轻的部位吻合或避开原吻合口部位吻合,二次吻合部位要减少张力,必要时需再度打开膈肌游离胃幽门、十二指肠球部。二次开胸要充分清理胸腔壁层及脏器表面的脓苔,用 1:10 的碘伏溶液浸泡胸腔 2 分钟后用温盐水冲洗,减轻胸腔污染。5 例中除 1 例死亡外,其余 4 例均再住院 14 天后出院。3 例吻合口瘘口小于 1cm,行单纯修补术的患者均获得成功,体会关键在于早期明确吻合口瘘的发生,胸腔污染轻,瘘口边缘食管、胃壁组织水肿轻。3 例均行修剪瘘口边缘坏死组织至组织新鲜有鲜血外流,行粘膜内翻单层吻合,利用附近带蒂胸膜瓣覆盖。笔者认为单纯修补术具有手术简单,创伤小的优点,适合于瘘口小于 1cm 的患者。

(收稿:1997-03-28)